

# 柑桔梢叶中的赤霉酸的薄层荧光法测定

马志超 张上隆 储可铭

(浙江农业大学中心实验室, 310029, 杭州)

**摘要** 本文利用薄层荧光扫描法定量测定了柑桔嫩梢叶片中的赤霉酸  $GA_3$ 。样品经过乙酸乙酯反萃取及 PVP-硅藻土层析柱后,再经 XAD-7 柱浓缩。在经过 105℃ 活化 30 min 的硅胶板上,以氯仿-乙酸乙酯-冰醋酸(5:4:1)为展开剂进行展开。用浓硫酸-乙醇溶液(90:10)显色,在 CS-930 双波长薄层扫描仪上进行荧光扫描。 $GA_3$  的平均回收率为 82.4%,标准偏差为 2.8%,最低检出量为 5 ng。

**关键词** 柑桔叶片;赤霉酸  $GA_3$ ;薄层荧光扫描

**中图分类号** O657.7

赤霉酸  $GA_3$  是一种重要的植物内源激素,它在植物组织内含量很低,但对植物的发芽,生长,开花和结果起着重要的作用。

近年来利用 GC/MS 方法(John et al, 1985)分析植物中 GA 类物质,检测灵敏度高,能分离 20 多种 GA 类物质。但仪器昂贵难以普及。由于植物组织内含有大量的各种杂质干扰了赤霉酸  $GA_3$  的分离和检测,为此,国内外许多学者在样品的抽提和纯化方面做了大量的探索(罗正荣等, 1990; Barendse et al, 1980; Durley et al, 1972; Gilemn et al, 1972; John et al, 1985; Patricia, 1984; Shozo et al, 1988)。

本文以 PVP-硅藻土层析柱净化,大网状树脂 XAD 7 进行富集,荧光薄层扫描法检测简化了前处理步骤,获得了较为满意的结果。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器和试剂

CS-930 双波长薄层扫描仪(Shimadzu 公司 日本)B-321 超声波发生器(Branson 公司 美国)

赤霉酸  $GA_3$  (Gibberlin A<sub>3</sub>, 90% SIGMA 公司); 聚乙烯吡咯烷酮(水不溶性 PVP) (Polyclar AT Serva 公司); 硅藻土(Celite Witco 公司); 硅胶 G(E Merck 公司); 大网状树脂 XAD-7(Amberlite XAD-7 Serva 公司); 乙酸乙酯, 甲醇, 磷酸均为 AR 级。

### 1.2 硅胶板和层析柱的准备

在 20 cm × 15 cm 清洁玻璃板上,用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液——硅胶 G(3/1 W/V) 制成药 0.3 mm 厚度的 CMC 硅胶薄层板,自然晾干之后,在 110℃ 烘箱中活化 1 h, 然后

1993-04-10 收稿

在甲醇/氯仿(1:1)中预展,以除去杂质。

经筛选的40~60目大网状树脂 XAD-7,用甲醇反复漂洗7次,然后用乙醚,索氏抽提24 h,自然晾干之后,称取约3.0 g 处理过的 XAD-7树脂,加20 mL 蒸馏水,装成15 cm ×  $\varnothing$ 1 cm XAD-7浓缩柱。然后用30 mL pH2.7磷酸缓冲液平衡。

PVP-硅藻土柱采用干法装填,称取约2.0 g PVP 装入 $\varnothing$ 2 cm 层析柱,然后再装上1.5 g 硅藻土,上层铺一层脱脂棉。

### 1.3 样品的抽提和纯化

采集柑桔嫩稍上的叶片7.50 g 加80 mL 4℃的甲醇,匀浆后,置超声波发生器中超声抽提1 h,再离心150 min(4 000 r/min),所得残渣,重复上述步骤2次,合并3次甲醇抽提液,减压蒸干(温度低于45℃),残渣用50 mL 0.1 mol/L pH8.0磷酸缓冲液洗脱,再用1 mol/L 磷酸将洗脱液调至 pH2.7。然后用15 mL 乙酸乙酯分3次萃取洗脱液,此时 GA<sub>3</sub>转入酯相,接着再用300 mL 0.2 mol/L pH8.0的磷酸缓冲液分3次反萃取乙酸乙酯,GA<sub>3</sub>重新转入水相。

含有 GA<sub>3</sub>的缓冲液通过装填好的 PVP-硅藻土柱子之后,用1 mol/L 磷酸把 pH 调至2.7,过准备好的 XAD-7浓缩柱。此时 GA<sub>3</sub>被吸附在 XAD-7树脂上,用40 mL 无水乙醇淋洗 XAD-7柱,丢弃开始10 mL 淋洗液,收集后面30 mL 乙醇洗脱液,减压浓缩至1 mL,供 TLC 分析。

### 1.4 薄层荧光扫描法测定

经预展的硅胶板,在105℃烘箱中活化30 min 在已活化的硅胶板上点上10  $\mu$ L 样品液和50~100 ng 的标准 GA<sub>3</sub>,展开剂为氯仿-乙酸乙酯-冰醋酸(5:4:1)。上行展开10~12 cm。

展开完的硅胶板,待溶剂挥发之后,喷上硫酸-乙醇(9:1)溶液,再在95℃烘箱中加热5 min 左右,此时在365 nm 紫外灯下,GA<sub>3</sub>形成绿色荧光斑点。

扫描采用荧光检测方式,激发波长为366 nm 发射波长450 nm,扫描光束为6 mm × 1.2 mm,扫描方式线性。

## 2 结果和讨论

### 2.1 标准 GA<sub>3</sub>的色谱分离和检测

图1为标准 GA<sub>3</sub>(25 ng)的薄层荧光扫描色谱图, R<sub>f</sub> 为0.44,随着硅胶板活度增大,R<sub>f</sub> 值也增大,GA<sub>3</sub>与溶剂前沿峰靠近,测定误差增大,因此硅胶板的活化温度宜控制在100~105℃,活化时间应在30 min 左右。且硅胶板应经过预展,以除去硅胶中的荧光杂质。

喷上硫酸-乙醇溶液之后的硅胶板放入烘箱中,烘箱温度应控制在95℃左右,加热时间在5~10 min,

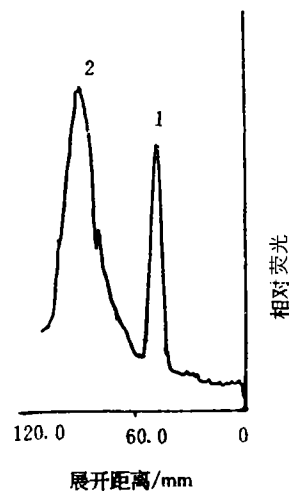


图1 标准 GA<sub>3</sub>的色谱图

1. GA<sub>3</sub>
2. 溶剂前沿峰

温度过高,时间太长易造成斑点组份炭化,荧光衰减。

显色之后硅胶板,宜立即扫描,因  $GA_3$  的荧光强度随时间呈负指数规律  $y = y_0 \cdot e^{-0.48t}$  下降。 $y_0$  为刚从烘箱中取出的  $GA_3$  斑点的相对荧光强度,  $t$  为时间(h),半衰期为1.44 h。

## 2.2 线性研究

在同一块硅胶板上点上5~100 ng 不同量的  $GA_3$  标准液,按前述方法检测,经计算荧光峰面积和含量之间的相关系数  $r = 0.9989$ 。如图3所示。

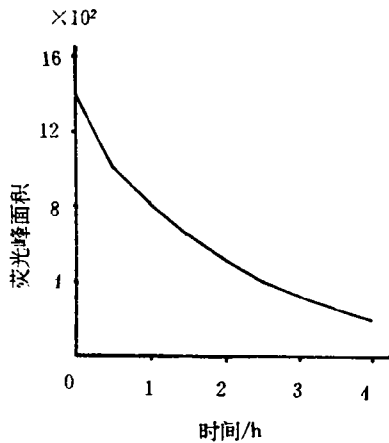


图2  $GA_3$  斑点的荧光强度与时间的关系曲线

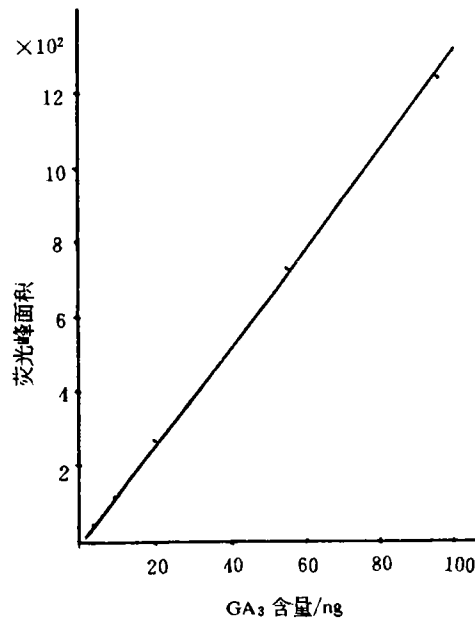


图3  $GA_3$  的工作曲线

## 2.3 样品的测定和回收率研究

图4为柑桔嫩梢叶片组织的色谱图,图5为添加了标准  $GA_3$  的样品色谱图,在5 g 样品中加入标准  $GA_3$  按前述方法经4次重复测定,测得柑桔嫩梢叶片组织中  $GA_3$  的含量为  $120.0 \pm 4.5$  ng/g 由于到目前为止,在植物组织中已发现了60余种 GA 类物质,因此,在  $GA_3$  荧光斑点中很可能含有其它的 GA 类物质,使测定数值偏高。

在萃取和反萃取过程中,必须注意 pH 值,当磷酸缓冲液 pH 值为6.5时,回收率仅为52%。

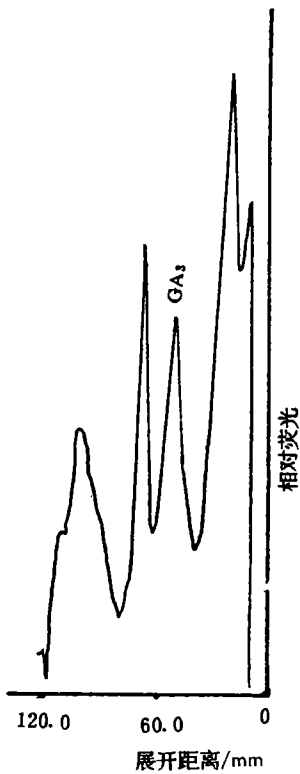


图4 柑桔叶片的色谱图

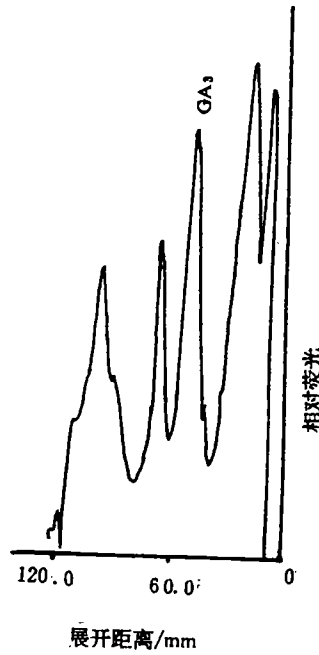
图5 添加标准 GA<sub>3</sub> 的样品色谱图

表1 方法回收率结果

添加量/ng	检出量/ng	回收率/%	平均值/%	标准差/%
800	656.0	82.0		
800	683.5	85.4	82.4	2.78
800	624.2	78.0		
800	672.0	84.0		

本方法以柑桔叶片为样本,同时也可用以测定其它植物中的赤霉酸 GA<sub>3</sub>,这对于深化植物内源激素生理作用研究提供了一个较为简便的方法。

## 参 考 文 献

- 罗正荣,朱丽华,吴谋成,等. 1990. 植物组织中赤霉酸含量的高效液相色谱测定. 植物生理学通讯, (2):50~52
- Barendse G W M, Varde werker P H. 1980. High-performance liquid chromatography of Gibberellins. J Chromato, (198):449~445
- Durley R C, Cuozier A, Pharis R P, et al. 1972. Chromatography of 33 Gibberellins on a gradient

- eluted silica gel partition column. *Phytochemistry*, (11): 3029
- Glehn T L, Kuo C C, Dukley R C, et al. 1972. Use of Insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. *Phytochemistry*, (11): 345~351
- John K D, Einar J, Olari J, et al. 1985. Identification of endogenous gibberellins from salix pentandra. *Plant Physiol*, (78): 473~476
- Patricia H S. 1984. High-performance thin-layer chromatography of Gibberellins in Fermentation Broths *Anal Chem*, (56): 1600~1603
- Shozo F, Hisakazu Y, Clive R et al. 1988. Qualitative and quantitative analyses of gibberellins in vegetative shoots of normal dwarf-1, dwarf-2, dwarf-3 and dwarf-5 seedlings of *Zea mays*l. *Plant Physiol*, (88): 1367~1372

## DETERMINATION OF GIBBERLLIN GA<sub>3</sub> IN CITRUS TISSUE BY TLC FLUORESCENCE SCAN

Ma Zhichao Zhang Shanglong Chu Keming  
(Central Laboratory Zhejiang Agr. Univ. ,310029, Hangzhou)

**Abstract** This paper presents a method to determine Gibberllin GA<sub>3</sub> in citrus tissue by TLC Fluorescence scan. The sample, after being purged by reversed extraction and purified by PVP-kieselguhr column, was enriched through Amberlite XAD-7 column. TLC Plate, coated with silica gel G, was activated at 105°C for 30 min. A 10ul-volume of sample solution was spotted. The plate was developed with chloroform-ethyl acetate-acetic acid (5:4:1), then sprayed with concentrated sulphuric acid containing 10% ethanol, heated at 95°C for 5~10 min, and finally Fluorescence scanned in a CS-930 scanner. The recovery rate by this method is 82.4% S. D. 2.78%. The limit of detection is 5 ng.

**Key words** Citrus tissue; Gibberllin GA<sub>3</sub>; TLC Fluorescence scan